压电式微喷技术在细胞打印领域的应用[1]

孙怀远[1]，宋晓康[2]，廖跃华[1]，李晓鸥[1]

(1.上海健康医学院医疗器械学院，上海 201318
2.上海理工大学医疗器械与食品学院，上海 200093)

摘要：细胞获取和培养的过程是组织工程构建的重要环节；3D 生物打印技术可以支撑组织工程的发展。通过“声波”使微量流体在惯性力和流体粘性力相互作用下实现脉冲流动的压电式微喷技术应用于细胞打印领域属于新兴工艺，具有精度高、效率高、成本低等特征。在介绍压电式微喷技术系统和原理基础上，分析了压电驱动方式、压电参数、脉冲驱动电压波形、生物细胞油墨对细胞打印的影响；给出了压电式微喷技术在高存活率细胞获取、高效率构建细胞三维组织方面的应用研究案例；总结了其在细胞打印领域的应用现状，并指出研究方向及意义。

关键词：微喷技术；细胞打印；影响因素；应用研究

中图分类号　Q819　　　　　　　　**文献标志码**　A

The Application of Piezoelectric Micro-jetting Technology in the Field of Cell Bioprinting

SUN Huai-yuan[1], SONG Xiao-kang[2], LIAO Yue-hua[1], LI Xiao-ou[1]

(1. Medical Instrument College, Shanghai University of Medicine ＆ Health Sciences, Shanghai 201318, China
2. College of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract：The process of cell acquisition and culture is an important part of tissue engineering construction. Three-dimensional bioprinting technology can support the development of tissue engineering. Piezoelectric micro-jetting realize pulsating flow of trace fluid under the interaction of the inertial force and fluid viscous force by "sound wave", its application in the field of cell bioprinting belongs to the emerging technology, and it has the characteristics of high precision, high efficiency as well as low cost. Based on the introduction of micro-jetting technology system and principle, the effects of piezoelectric drive mode, piezoelectric parameters, pulse drive voltage waveform and bio-cell ink on cell bioprinting were analyzed, the cases studied of piezoelectric micro-jetting technology in high livability cell acquisition and efficient construction of cell three-dimensional tissue were provided, its application status in the field of cell bioprinting and research direction as well as significance were summarized.

Keywords：micro-jetting technology; cell bioprinting ; influence factors; application research

0　引言

用于组织修复、器官移植的组织器官紧缺是全世界面临的一大难题，包含生物材料学、细胞生物学、临床医学等一系列学科的组织工程可以构建人类仿生组织和器官，以解决上述难题[1]。而组织工程目前面临的问题主要有细胞获取和培养以及结构支架的构建[2]。但随着生物 3D (Three-Dimensional) 打印技术的出现和发展，组织工程所面临的问题也将得到逐步解决，因为生物 3D 打印技术可以实施细胞打印、结构支架构建等。

“生物 3D 打印”是一项在计算机辅助设计下的增材制造技术[3]，它以加工包括生物材料、生长因子和细胞等的活性材料为主要内容，以修复和重建具有复杂功能的人体组织和器官为目的，所以它也是跨学科、跨领域的新型再生医学工程技术。以技术产生时间和材料生物学性能为依据，生物 3D 打印技术发展可分为四个阶段[4]：打印材料无生物相容性要求，

基金项目：上海市生物医学工程学科建设项目(E1-2601-17-201002)

作者简介：孙怀远(通讯作者)，教授，研究方向为微量喷射与生物涂层技术，电子信箱：shy62123@163.com
宋晓康，研究生，研究方向为生物打印技术，电子信箱：snail.tian@qq.com

如体外医疗器械[5]；打印材料有生物相容性要求，但不可降解，如金属和陶瓷等永久性植入物；打印材料有生物相容性要求，且能被降解，如可促进组织再生的植入物；使用活细胞、蛋白及其他细胞外基质作为材料，打印三维生物结构体，甚至包括最新发展出的、增加时间维度的可打印自我组装材料的 4D 打印。细胞打印技术是生物 3D 打印发展的第四阶段，它是利用医学成像技术以及 3D 建模软件建立数字模型，将细胞和生物材料依据该数字模型完成精确堆积，并最终形成形状复杂的 3D 细胞结构[6-7]。细胞打印技术主要有激光引导直写、立体光刻印刷、生物绘图/生物三维打印、直接三维受控组装、喷墨打印（也可被称作微滴法）、批量细胞打印等技术[8-9]。本文针对基于喷墨打印原理的压电式微喷技术，分析其对细胞打印的影响、实施方式以及实际应用。

1　压电式微喷技术

微喷射是微流体控制应用的一个重要体现，压电式微喷打印的原理是利用压电陶瓷材料的伸缩形变行为使喷嘴中“墨汁”喷射出去而形成液滴[9-10]。压电式微喷打印系统如图 1 所示，主要由电控制器、气控制器、压电喷头和视觉观测组件构成。其中压电喷头如图 2 所示，喷头材料为玻璃毛细管，其中部外侧有压电陶瓷材料 PZT（piezoelectric transducer）。压电式微喷打印系统喷射机理为：气压控制器产生的负压将喷射油墨平衡于喷嘴位置；电驱动控制器施加脉冲波形，脉冲电压上升和保续过程中，喷头内部的压电陶瓷材料产生微弱的形变，形变造成压电陶瓷材料接触附近的玻璃毛细管壁并形成一种“声波”[11]，使得喷嘴处的溶液被挤压而喷射出去；当电压下降时，压电陶瓷因形变减缓而放松，玻璃毛细管膨胀，喷嘴处的墨水凹陷而“剪断”挤出的溶液，在墨水表面张力作用下，挤出的溶液将会逐渐聚集形成单一液滴，从而实现满足一定规律的喷射打印。

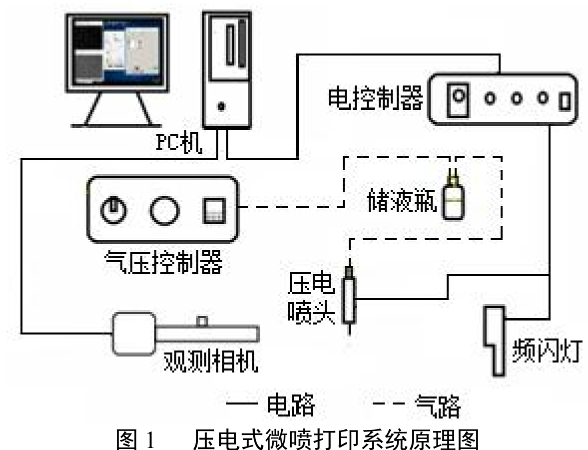


图 1　压电式微喷打印系统原理图

Fig.1　Principle diagram of piezoelectric micro-jet printing system

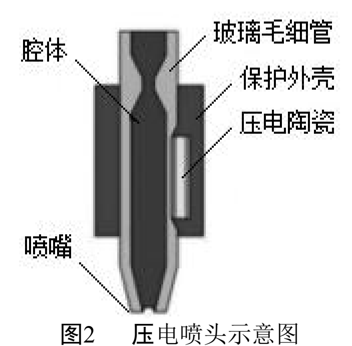


图2　压电喷头示意图

Fig.2　Piezoelectric nozzle diagram

微喷技术最早应用于微纳电子印刷、生物传感器等工程制造领域，随着技术的不断深入，近年来微喷技术在获取生物细胞和打印器官组织等生物领域的应用取得了快速发展。蔡仁烨[12]利用自主研制的细胞打印装置，基于压电喷射成功打印酵母细胞，并分析了脉冲电压、生物油墨浓度、粘度和缓冲介质等对生物细胞打印成活率的影响； Xu C 等[13]研究了成纤维

细胞和海藻酸钠混合的生物油墨的液滴生成过程；Kim Y K 等[14]使用压电喷头成功获取老鼠成纤维细胞和人胚肾细胞，并通过后期培养、增殖验证了压电微喷技术对哺乳动物细胞打印成活不会造成损伤的观点；Kim J D 等[15]用压电式微喷射技术打印人类脂肪干细胞；Ng W L 等[16]研究并验证了新生儿包皮成纤维细胞 HFF（human foreskin fibroblast）的打印可行性。在组织器官打印领域，Lee J H 等[17]报道了一种微流体三维骨骼模型，在该模型制备过程中，微喷技术制备了含有抗生素和双相磷酸钙纳米颗粒的微结构，并与微流芯片和细胞培养相结合，加速了骨骼和植入物的结合同时可以防止细菌感染；Zhang J 等[18]通过自主研制的微喷设备在载玻片上精确制备了海藻酸钠微型结构，与相应的细胞阵列结构结合形成微流体芯片，用以模拟体内环境。

可见，压电微喷技术在生物细胞打印领域已取得了一系列进展，为细胞获取、组织器官再生等研究和应用提供了基础。

2　压电式微喷技术对细胞打印的影响

压电式微喷实施细胞打印的影响因素包括微喷技术条件和生物油墨性质。

2.1　压电驱动方式对细胞打印的影响

压电式微喷技术进行细胞打印有两种驱动方式，The R 等[19]对它们进行了对比研究，如图 3 所示。**a**、先膨胀后挤压：初始驱动电压不为零，溶液还未进入喷头前已经受力挤压，当电压降低时，压电陶瓷放松、喷头膨胀，而后电压升高，压电陶瓷挤压喷头喷出液滴，在下一次波形发生时切断液滴。该模式下可以产生更高的液滴喷射速度和更细长的液滴。b、先挤压后膨胀：初始驱动电压为零，当电压由零逐渐升高时，压电陶瓷挤压喷头从而挤出液滴，而后电压下降，压电陶瓷放松、喷头膨胀切断液滴。该模式下可以产生体积更大的液滴，喷射速率更平缓。

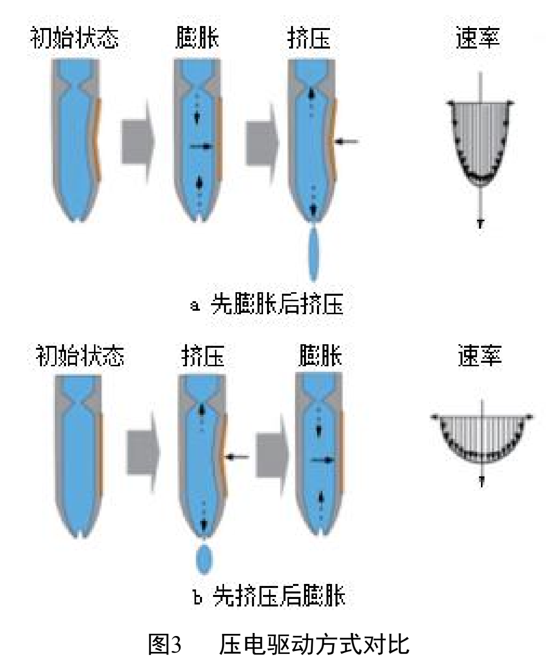


图3　压电驱动方式对比

Fig. 3　Comparison of piezoelectric drive mode

Yamaguchi S 等[20]对昆虫细胞 sf9（spodoptera frugiperda cell 的缩写）进行打印实验分析，证明“先挤压后膨胀”的方式更易于产生单细胞液滴（100 个液滴中全部只含有一个细胞），且与未进行喷射的细胞对比，发现细胞存活率都在 90%左右，喷射过程对细胞存活率不会造成明显影响。可见，对于细胞打印尤其是单细胞打印而言，“先挤压后膨胀”的压电驱动方式更合适。

2.2　压电参数对细胞打印的影响

打印过程中图文信息的传输与喷头中压电陶瓷激励脉冲的匹配情况影响微喷射的稳定性和准确性[21]。如前所述，压电喷头的驱动力来自于压电陶瓷材料的形变量，而压电陶瓷的形变量主要是由驱动电源的脉冲电压所决定的，所以，压电喷头的工作性能直接取决于电控制器提供的脉冲电压及频率，这直接影响到喷头最终形成液滴的尺寸、喷射速度、液滴均匀性和液滴脱离喷嘴后的直线性等，最终影响细胞打印效果。Zhang M 等[22]利用 3T3 鼠成纤维细胞和海藻酸钠混合溶液研究了脉冲电压对细胞分布的影响，结果表明：脉冲电压为 40V 时，细胞实际分布值与理论分布值相差 3%；脉冲电压为 50V 时，则相差 18%。另外，Saunders R E 等[23]利用成纤维细胞溶液研究了脉冲电压与电压持续时间对细胞活性的影响，得出的结论是：脉冲电压和电压持续时间变大，液滴速度增高，夹裹细胞的液滴与基板产生的撞击力增大，降低细胞存活率。可见，压电参数对细胞打印有着直接影响。

2.3　脉冲驱动电压波形对细胞打印的影响

电控制器为压电喷头提供的驱动电压波形有多种形态，Gan H Y 等[24]研究了单极波、双极波、M 形波、W 形波等不同波形驱动电压对液滴大小的影响。结果表明：双极波更加适合于牛顿流体或近似牛顿流体，对液滴体积减小影响更大；W 形波和 M 形波可调节范围小，但对非牛顿流体影响十分明显，能够减小液滴体积，从而降低线宽。压电微喷最常采用的波形为图 4 所示的双极梯形波：X 轴表示时间（μs），Y 轴表示脉冲电压值（V），参数包括脉冲电压幅值 Dwell Voltage（V）和 Echo Voltage（V）、正负电压保持时间 Dwell Time（μs）和 Echo Time（μs）、脉冲电压上升时间 Rise Time（μs）、脉冲电压下降时间 Fall Time（μs）。

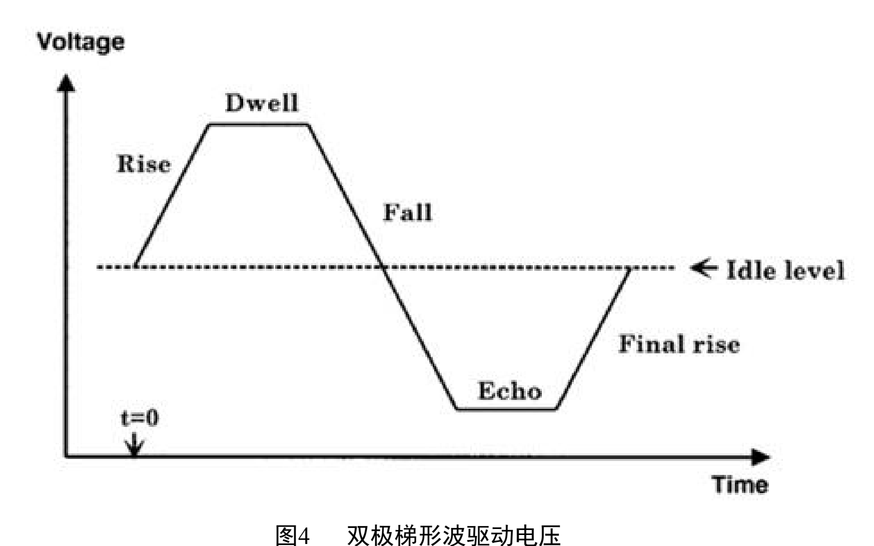


图4　双极梯形波驱动电压

Fig. 4　Bipolar trapezoidal wave drive voltage

随着微喷技术在细胞打印中的应用，为了满足越来越高的精度要求和打印很小的细胞液滴，可以通过使用较小直径喷嘴实现。但喷嘴的直径过小会导致喷嘴容易堵塞，大大降低打印过程的可靠性和重复性。为此，Kwon K S 等[25]基于波传导理论提出了一种微喷打印的高速波形设计方法，经过比较发现，对于高速微喷射打印而言，改进脉冲波形可以有效地抑制喷头喷射后的残余压力波，提高打印的稳定性。Lee Y I 等[26]通过压电微喷打印在聚酰亚胺表面形成精细线条图案，为了提高打印后的分辨率，通过改进脉冲波形的形态设计来缩短喷头内压电陶瓷的形变周期，进而辅助喷射出速度更快、精度更高的液滴。可见，对于细胞打印而言，改进脉冲驱动电压波形，可以通过改变压电陶瓷的形变频率，改善因细胞油墨黏度较高而出现堵塞不喷的现象，同时在一定程度上提高细胞打印的速度[27]。

2.4　生物细胞油墨对细胞打印的影响

生物细胞油墨对打印液滴稳定性影响研究已有一定成果。Fromm J E[28]对不同溶液进行测试分析，针对打印油墨的物理性质引入了重要无量纲参数 Z（与溶液密度、表面张力、粘度和喷嘴直径有关），并预测 $Z>2$ 时方能形成液滴进行喷射。Reis N 等[29]和 Derby B[30]对此

进行了证明，发现油墨 Z 值在 1~10 之间可以形成稳定液滴、进行喷墨打印。Jang D 等[31]在此基础上，通过检测稳定液滴形成过程中动力学的变化，在分析打印特性（如：单自由度、最小距离、位置精度、最大喷射频率）后，对 Z 值进行了重新精确定义：4≤Z≤14，即当溶液 Z 值低于 4 时，会出现拖尾情况难以使挤出的溶液聚集成稳定液滴；当 Z 值大于 14 时则不能形成稳定液滴进行打印。Chahal D 等[32]则具体利用成纤维细胞与海藻酸钠和聚苯乙烯混合溶液研究了浓度对液滴稳定性影响：随着生物细胞油墨浓度增大，液滴的体积和喷射速度增加，能抑制卫星液滴的生成，而液滴拖尾消除时间增大，但与颗粒悬浮溶液相比，生物细胞油墨喷射形成的液滴体积和喷射速度相对较小。Moon S 等[33]、Liberski A R 等[34]、Cheng E 等[35-36]以乳腺癌细胞 MCF-7 与 Ficoll PM400 和 PBS（phosphate buffer saline，磷酸盐缓冲液）混合溶液为材料研究了细胞油墨特性对细胞分布的影响：微喷射能精确控制液滴大小，但液滴中细胞分布并不均匀，不符合泊松分布；改变细胞油墨的粘度可以改善细胞沉积；细胞在压电喷嘴处沉积会对最终液滴中细胞分布造成影响，且容易堵塞喷嘴；在细胞油墨中加入悬浮液可改变细胞油墨流变特性，使细胞均匀分散、细胞分布近似于泊松分布，降低细胞聚集、堵塞喷嘴的现象。表 1 列出了几种生物油墨对细胞打印的影响。

表 1 几种生物油墨对细胞打印的影响

Table 1 Influence of bio-inks on cell printing

生物油墨	打印细胞	研究目的	实验结果	参考文献
聚乙烯吡咯烷	成纤维细胞	聚合物浓度对Z值和细胞打印稳定性的影响。	通过改变聚合物浓度调节Z值可以提高细胞打印稳定性和细胞存活率。	[16]
海藻酸钠和聚苯乙烯混合液	成纤维细胞	生物油墨浓度对打印细胞存活率的影响。	生物油墨浓度降低，打印细胞存活率相应提高。	[32]
聚蔗糖和磷酸盐缓冲溶液	乳腺癌细胞	生物油墨流变特性对细胞打印过程的影响。	改善生物油墨流变性可以降低细胞聚集、沉积现象。	[33-36]
无内毒素低酰基结冷胶悬浮液	小鼠成肌细胞	生物油墨流变特性对打印细胞存活率的影响。	生物油墨流变性好，则打印的细胞存活率高。	[37]

3 压电式微喷技术实施细胞打印的优势

压电式微喷技术作为一种非接触式打印方式，经过近几年的发展，已经在组织工程、生物医药领域、柔性可穿戴设备、光学器件等领域得到一定的应用。在细胞打印方面的应用优势，主要体现在如下两大方面：

3.1 高存活率细胞获取

细胞获取和培养的过程是最终组织生成的重要一环，因此，细胞打印目前在生物医学组织工程领域得到了大量的关注和研究。早期有学者指出：压电式微喷射打印技术会破坏细胞膜，导致细胞死亡[38]。而经过大量实验的数据表明，压电式微喷射打印过程中发生的微弱形变、“声波”以及可接受的喷射速度对细胞的损伤微乎其微，并不会导致细胞死亡，相反，其参数可调节范围广、成本低以及细胞存活率高的特点，使其逐渐成为细胞打印的主流趋势[39-40]。

Xu T 等[41]于 2005 年应用微喷射技术实现了哺乳动物仓鼠卵巢细胞打印，且超过 90%的细胞能够保持活性，经细胞培养基处理和培养，证明细胞在 25 天的培养过程中不断增殖；在随后的研究中，又将人类成纤维细胞存活率提高至 94%~98%。英国剑桥大学研究小组[42]于 2013 年使用一种压电喷墨打印头，让成年老鼠的神经胶质细胞（glia cell）和视网膜神经节细胞 (retinal ganglion cells)通过一个不到 1 毫米的喷嘴“打印”出来，尽管有大量细胞因为沉积在喷墨液底部无法被“打印”出来，造成了损失，但已“打印”出来的细胞都很健康，虽然经过喷嘴喷射，但柔弱的细胞膜仍旧存活着，并能在培养器中生长和保持正常生物特性。Ferris C 等[37]以无内毒素低酰基结冷胶悬浮液为生物油墨打印了小鼠成肌细胞，其存活率>95%。2016 年以来，Detsch R 等[43]分析了压电喷墨参数对结直肠癌上皮细胞打印的影响，并将骨髓基质细胞打印培养，存活率达到 98%；Kim Y K 等[14]用不同直径的喷头对老鼠成

纤维细胞和人胚肾细胞进行打印，存活率>94%；**Ng W L** 等[16]用 50μm 喷头打印新生儿包皮成纤维细胞，存活率达 95%。这些研究证明，利用压电式微喷射技术能够进行细胞打印，并且保持较高的细胞存活率。表 2 列出了几种细胞压电式打印的情况。

表 2 几种细胞压电式打印情况

Table 2 Several cell piezoelectric printing

细胞种类	生物油墨	打印喷头	细胞存活率	参考文献
酵母细胞	酵母-麦芽汁溶液	F181010压电打印头	96%	[12]
鼠成纤维细胞	胎牛血清-抗生素/抗真菌溶液	30μm压电喷头	94.4%	[14]
新生儿包皮成纤维细胞	聚乙烯吡咯烷酮基混合液	50μm压电喷头	95%	[16]
小鼠成肌细胞	无内毒素低酰基结冷胶悬浮液	XAAR-126 压电喷墨打印头	95%	[37]
仓鼠卵巢细胞	磷酸盐缓冲液	改进的 HP51626a 压电打印头	90%	[41]
骨髓基质细胞	纤维蛋白原和凝血酶悬浮液	50μm 压电喷头	98%	[43]

低温贮藏是一种常见的细胞培养方法，细胞悬浮液由液态快速转变为玻璃化过程中产生的冰晶会对细胞造成损伤，高浓度的冷冻保护液毒性也会对细胞造成损伤，但高转化速率能够降低冰晶的产生[44-45]。因此，喷射打印产生的微量液滴十分重要。Dou R 等[46]应用压电微喷射打印技术将老鼠成纤维细胞和人神经干细胞打印，并使用低温方式贮藏，如图 5 所示。与传统的液体低温保存方式相比，使用压电式微喷射技术喷射的皮升级细胞液滴能够降低热扩散长度、提高冷冻速率、大大减少冷冻保护液的浓度，从而减小低温贮藏对细胞的损伤。

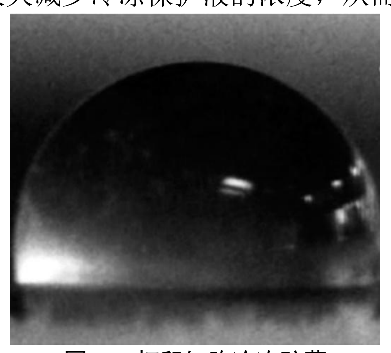


图5 打印细胞冷冻贮藏

Fig. 5 Cryopreservation for printed cell

药物开发过程中需要进行临床前的药效、安全性、剂量等相关测试，目前大部分使用动物模型来进行。但动物模型和人体环境对药物的反应有许多不同，因此会导致药物最终无法使用，拖延了药物的开发周期[47-48]。Park T M 等[49]使用压电微喷射技术打印子宫颈癌细胞，将其定量、定位地喷射至纳米纤维膜表面并形成组织阵列，如图 6 所示。通过酶联免疫吸附测定法测量培养效果，并用一种抗癌药物测试，结果显示癌细胞存活率近似 100%，并且与基质金属蛋白酶 2 和 9 有很高的亲和力，对药物哆嗦美素的抗性较高。

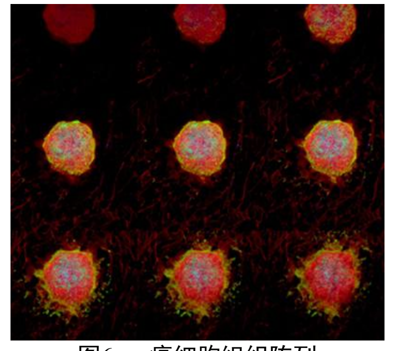


图6 癌细胞组织阵列

Fig. 6 Tumor tissue array

实验证明，使用压电式微喷射打印技术培养的细胞与传统工艺培养的细胞相比，其最终存活率并没有降低。

3.2 高精度和高效率构建细胞三维组织

分层打印生物 3D 组织已经成为用以解决器官短缺、难于培养问题的一个新方向。目前，组织器官打印技术尚未成熟，打印设备种类繁多，有微挤压式[50-53]、电磁阀式[54]、激光式[55-58]、压电式[12,14,27]等。相对而言，压电式微喷射打印技术应用于组织工程领域具有高精度和高效率优势：（1）可以喷射微米级直径、皮升级体积的高精度液滴；系统具有高达 1μm 的运动精度，完全可以满足生物活体组织空间排列（细胞之间大部分呈 10μm 间距排列）的打印要求。（2）可以实现的频率高达 30kHz，可实现每秒 3 万个细胞打印；可以集成多通道打印，提高打印效率[9,11,59]。

Christensen K 等[60]针对细胞结构的复杂性进行了实验测试，采用海藻酸钠和小鼠纤维细胞海藻酸盐作为生物油墨，氯化钙溶液作为交叉链接剂和支撑材料，成功打印出图 7 类似血管的水平和垂直分支结构，并保证了打印 24h 后细胞 90％以上的存活率。

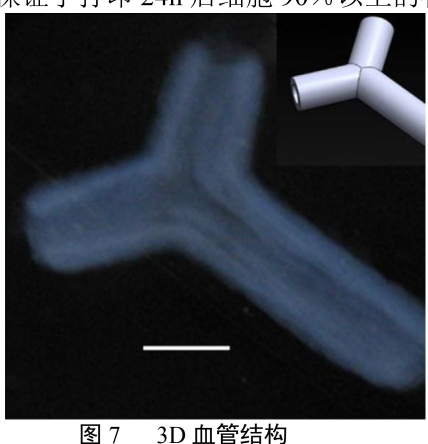


图 7 3D 血管结构

Fig.7 3D vascular structure

图 8 是 Suntivich R 等[61]通过压电式微喷射打印设备形成的细胞储存“丝巢”阵列。丝巢材料为经过聚赖氨酸和聚谷氨酸侧链修饰后的丝聚电解质，经过多层喷墨打印快速形成了直径 70~100μm、厚度为几百纳米的丝巢结构，为细胞阵列储存打印、包装、培养提供了载体。

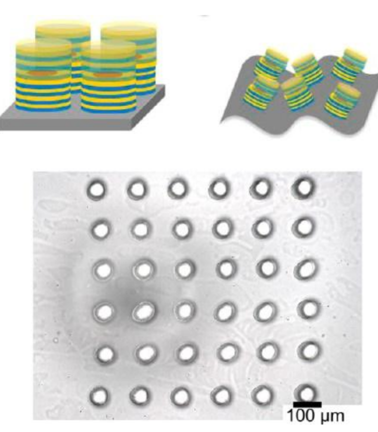


图 8 细胞储存丝巢阵列

Fig.8 Silk nest array for cell stores

Lorber B 等[42]及 Owens C M 等[62]应用压电式喷墨生物打印系统证明了小鼠骨髓干细胞和大鼠视网膜神经节细胞打印构建神经管等神经系统的可行性。Lee V 等[63]使用 3D 喷墨打印技术将胶原蛋白、角化细胞、成纤维细胞分别印刷在不同的结构层，创建了一个具有真皮和表皮结构的模拟皮肤组织，然后将打印的皮肤放置在气液界面培养 2 周，发现角化细胞正常

分化形成多层表皮角质层。Xu T 等[64]以含有兔软骨细胞弹性纤维蛋白和胶原蛋白的混合水凝胶作为生物油墨，通过混合喷墨打印系统制备 1mm 厚的组织工程软骨支架来满足软骨组织的生物力学性能，然后在体外培养 1 周后发现水凝胶支架中超过 80%的软骨细胞仍保留增殖活性，生物力学检测发现软骨支架的机械性能有明显增强，具有良好的生物学性能。

由于压电式微喷射打印的液滴精度、高喷射速率以及可多通道打印的特点，使其不仅能实现单细胞打印，还可以同时打印多种细胞、细胞外基质和生物材料，并在高通量的细胞排列或繁重复杂的组织结构打印方面有着潜在的优势，为器官制造移植提供有力保障。

4 总结

压电式微喷技术高精度、高效率、非接触式和低成本的优点，使其在生物细胞打印领域应用关注度越来越高，并具有十分广泛的发展前景。目前，微喷射打印在细胞培养和组织工程领域已经开展诸多拓展，不仅仅局限于简单的三维构架，更对细胞的培养、组织器官多样细胞的打印构建、生物传感器打印、DNA 合成等方面提出了更高的要求。由此提出的问题是如何进一步提高细胞的存活率、如何保证细胞打印前后的培养环境、如何精确控制打印参数与生物油墨对细胞打印的影响？因此，微量喷射技术在细胞打印领域的研究以及复杂结构前期设计和后期处理都是需要发展创新的部分。相信在不久的将来，随着人工智能和材料科学的不断进步，生物打印组织器官能够利用在生物细胞打印领域愈发成熟的微喷射技术而实现突破。

参考文献（References）

[1] 金灿，陈振琦.应用 3D 打印技术制作组织工程支架:修复骨缺损的研究回顾[J].中国组织工程研究，2017,21(10):1611-1616.
Jin C, Chen Z Q. Tissue-engineered scaffold preparation using three-dimensional printing technology:a retrospective study on bone repair[J].Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2017, 21(10):1611-1616.

[2] 曹雪飞，宋朋杰，乔永杰，等.3D 打印骨组织工程支架的研究与应用[J].中国组织工程研究，2015, 19(25):4076-4080.
Cao X F, Song P J, Qiao Y J, et al. 3D printing of bone tissue engineering scaffolds [J].Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2015, 19(25):4076-4080.

[3] 王雪欣，张明谏，李小兵，等. 3D 生物打印在组织/器官类似物制造领域的应用[J].中国组织工程研究，2018，22(10): 1611-1617.
Wang X X, Zhang M J, Li X B, et al. Three-dimensional bioprinting of tissue/organ analogues: a review on techniques, materials and processes[J].Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2018, 22(10):1611-1617.

[4] 徐弢.生物 3D 打印在神经科学领域的最新进展[J].中华神经创伤外科电子杂志，2018，4(2): 65-67.
Xu T. The latest advances of biological 3D printing in the field of neuroscience [J].Chin J Neurotrauma Surg (Electronic Edition), 2018, 4(2): 65-67.

[5] 韩倩宜，李淑萍，肖雄夫，等.3D 打印技术在植入式医疗器械中的应用[J].科技导报，2017，35（2）: 72-79.
Han Q Y, Li S P, Xiao X F, et al. 3D Printing: The application in medicine devices[J].Science ＆Technology Review, 2017, 35(2): 72-79.

[6] 杨润怀，陈月明，马长望，等.生物细胞三维打印技术与材料研究进展[J].生物医学工程学杂志, 2017, 34(2):320-324.
Yang R H, Chen Y M, Ma C W, et al. Research progress on the technique and materials for three-dimensional bio-printing[J].Journal of Biomedical Engineering, 2017,34(2):320-324.

[7] Gu Q, Hao J, Lu Y J, et al. Three-dimensional bio-printing[J].Sci China Life Sci, 2015, 58(5): 411-419.

[8] 魏玉雪，刘晓秋，李迪，等.3D 打印技术在细胞打印方面的应用与发展[J].海南医学，2017，28(5): 801-804.
Wei Y X, Liu X Q, Li D, et al. Application and development of 3D printing technology in cell printing [J].Hainan Med J, 2017,28(5): 801-804.

[9] 周丽宏，陈自强，黄国友，等.细胞打印技术及应用[J].中国生物工程杂志，2010，30(12) :95-104.
Zhou L H, Chen Z Q, Huang G Y, et al. The Application of Cell Bioprinting [J]. China Biotechnology, 2010,

30(12) :95-104.

[10] Sivaraman A, Leach J K, Townsend S, et al. Am icroscale in vitro physiolog icalmodel of the liver: pred ictive screen s for drug metabo lism and enzyme indu ction[J]. Current Drug Metabolism, 2005, 6(6) : 569-592.

[11] 叶青，王文军，鱼泳，等.3D 生物打印在再生医学中的应用及展望[J].医疗卫生装备, 2016, 37(10): 121-123.
Ye Q, Wang W J, Yu Y, et al. Application and prospects of 3D bioprintnig in regenerative medicine [J]. Chinese Medical Equipment Journal, 2016, 37(10): 121-123.

[12] 蔡仁烨.细胞打印过程中的细胞受损分析[D].西安：西安电子科技大学, 2013.
Cai R Y. Cell Damage Analysis in Cell Printing [D]. Xian: Xidian University, 2013.

[13] Xu C, Zhang M, Huang Y, et al. Study of droplet formation process during drop-on-demand inkjetting of living cell-laden bioink[J]. Langmuir, 2014,30 (30) :9130-9138.

[14] Kim Y K, Park J A, Yoon W H, et al. Drop-on-demand inkjet-based cell printing with 30-μm nozzle diameter for cell-level accuracy [J]. Biomicrofluidics, 2016, 10 (6): 064110.1-064110.11.

[15] Kim J D, Choi J S, Kim B S, et al. Piezoelectric inkjet printing of polymers: stem cell patterning on polymer substrates[J]. Polymer(Guildf), 2010, (51):2147-2154.

[16] Ng W L, Yeong W Y, Naing M W, et al. Polyvinylpyrrolidone-based bio-ink improves cell viability and homogeneity during drop-on-demand printing [J]. Materials, 2017, 10 (2): 190.1-190.12.

[17] Lee J H, Gu Y, Wang H, et al. Microfluidic 3D bone tissue model for high-throughput evaluation ofwound-healing and infection-preventing biomaterials [J]. Biomaterials, 2012 , 33 (4) :999-1006.

[18] Zhang J, Chen F, He Z, et al. A novel approach for precisely controlled multiple cell patterning in microfluidic chips by inkjet printing and the detection of drug metabolism and diffusion[J].Analyst, 2016,141 (10) :2940.

[19] The R, Yamaguchi S. Piezoelectric inkjet-based single-cells printing by image processing for high efficiency and automatic cell printing[C]//17th International Conference on Miniaturized, 2013:1656-1658.

[20] Yamaguchi S, Ueno A, Akiyama Y, et al. Cell patterning through inkjet printing of one cell per droplet[J]. Biofabrication, 2012,4(4):045005.

[21] Kang W S, Koh J H.（1-x）Bi0.5Na0.5TiO3-TiO（3）lead-free piezoelectric ceramics for energy-harvesting applications[J]. Materials Science, 2015, (5):2057-2064.

[22] Zhang M, Hongtao Song, Changxue Xu. Study of living cell distribution during inkjet printing of bioink[C]//Proceedings of the ASME International Manufacturing Science and Engineering Conference 2017. Los Angeles, USA:MSEC, 2017:2921.

[23] Saunders R E, Gough J E, Derby B. Delivery of human fibroblast cells by piezoelectric drop-on-demand inkjet printing[J].Biomaterials, 2008,(29):193-203.

[24] Gan H Y, Shan X C, Eriksson T, et al. Reduction of droplet volume by controlling actuating waveforms in inkjet printing for micro-pattern formation[J]. Journal of Micromechanics and Microengineering, 2009,(19):055010.1-055010.8.

[25] Kwon K S, Kim W. A waveform design method for highspeed inkjet printing based on self-sensing measurement[J].Sensors and Actuators, 2007, (4):75-83.

[26] Lee Y I, Kwon Y T, Lee K J, et al. A novel method for fine patterning by piezoelectrically induced pressure adjustment of inkjet printing[J].Electronic Materials, 2015,44(8):2608-2614.

[27] 夏京瑞,周奕华,钱俊,等. 基于细胞打印的压电式喷墨头研究进展[J].包装工程, 2016,37(9): 129-133,155.
Xia J R, Zhou Y H, Qian J, et al. Research Progress of Piezoelectric Inkjet Head Based on Cell Printing[J]. Packaging Engineering, 2016,37(9): 129-133,155.

[28] Fromm J E. Numerical-calculation of the fluid-dynamics of drop-on-demand jets[J]. IBMJ.Res. Dev, 1984, 28(3):322-333.

[29] Reis N, Ainsley C, Derby B. Ink-jet delivery of particle suspensions by piezoelectric droplet ejectors[J].Journal of Applied Physics, 2005,97 (9) :815.

[30] Derby B. Inkjet printing of functional and structural materials: fluid property requirements， feature stability，and resolution[J]. Annu.Rev. Mater. Res，2010，(40)：395-414.

[31] Jang D, Kim D, Moon J. Influence of fluid physical properties on ink-jet printability[J]. Langmuir, 2009,25(5):2629-2635.

[32] Chahal D, Ahmadi A, Cheung K C. Improving piezoelectric cell printing accuracy and reliability through

neutral buoyancy of suspensions[J].Biotechnology & Bioengineering, 2012, 109(11):2932-2940.
[33] Moon S, Ceyhan E, Gurkan U A, et al. Statistical Modeling of single target cell encapsulation[J]. PLoS One, 2011, (6):e21580.
[34] Liberski A R, Schubert U S. One cell-one well: A new approach to inkjet printing single cell microarrays[J].ACS Combinatorial Science, 2010, (13)；190-195.
[35] Cheng E, Yu H, Ahmadi A, et al. Rheological manipulation for improved reliability in inkjet printing of living cells[C]//2016 IEEE 29th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems. Shanghai, China: IEEE, 2016:784-787.
[36] Cheng E, Ahmadi A, Cheung K C. Investifation of the hydrodynamics of suspended cells for reliable inkjet cell printing[C]//ASME 2014 12th International Conference on Nanochannels, Microchannels, and Minichannels. Chicago, USA:Asme International Conference on Nanochannels 2014:V001T03A010.
[37] Ferris C, Gilmore K, Beirne S, et al. Bio-ink for on-demand printing of living cells[J].Biomaterials Science, 2013, 1 (2) :224-230.
[38] Cui X, Dean D, Ruggeri M. Cell damage evaluation of thermal inkjet printed chinese hamster ovary cells[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2010, 106(6):963-969.
[39] Ozbolat I, Yu Y. Bioprinting toward organ fabrication: Challenges and future trends[J]. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 2013,60 (3) :691-699.
[40] Ringeisen B R, Pirlo R K, Wu P K, et al. Cell and organ printing turns 15: Diverse research to commercial transtitions[J]. MRS Bull, 2013,(38):834-843.
[41] Xu T, Joyce J, Cassie G, et al. Inkjet printing of viable mammalian cells[J].Biomaterials, 2005, 26 (1):93-99.
[42] Lorber B, Hsiao W K, Hutchings I M, et al. Adult rat retinal ganglion cells and glia can be printed by piezoelectric injet printing[J]. Biofabrication, 2014, 6(1):152-163.
[43] Detsch R, Blob S, Zehnder T, et al. Evaluation of cell inkjet printing technique for biofabrication[J]. BioNanoMat, 2016, 17(3):185-191.
[44] Zhang X, Catalano P N, Gurkan U A, et al. Emerging technologies in medical applications of minimum volume vitrification[J]. Nanomedicine, 2011, (6):1115-1129.
[45] Yong K W, Safwani W K, Xu F, et al. Assessment of tumourigenic potential in long-term cryopreserved human adipose-derived stem cells[J].Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2016,11(8) :2217-2226.
[46] Dou R, Saunders R E, Mohamet L, et al. High through put cryopreservation of cells by rapid freezing of sub-μl drops using inkjet printing-cryoprinting[J]. Lab Chip, 2015, (15):3503-3513.
[47] Dimasi J A, Feldman L, Seckler A, et al. Trends in risks associated with new drug development:Success rates for investigational drugs[J]. Clin. Pharmacol. Ther, 2010, 87 (3) :272.
[48] Hay M, Thomas D W, Craighead J L， et al. Clinical development success rates for investigational drugs[J].Nature Biotechnology, 2014 , 32 (1) :40-51.
[49] Park T M, Kang D, Jang I, et al. Fabrication of in vitro cancer microtissue array on fibroblast-layered nanofibrous membrane by inkjet printing[J].International Journal of Molecular Sciences, 2017,18(11):2348.
[50] Cohen D L. Direct freeform fabrication of seeded hydrogels in arbitrary geometries[J]. Tissue Engineering, 2006, (12):1325-1335.
[51] Jakab K. Three-dimensional tissue constructs built by bioprinting[J]. Biorheology，2006,(43)：509-513.
[52] Ozbolat I T, Hospodiuk M. Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting[J]. Biomaterials, 2016, (76):321-343.
[53] Visser J. Biofabrication of multi-material anatomically shaped tissue constructs[J]. Biofabrication，2013，(5):035007.
[54] Faulkner-jones A, Fyfe C, Cornelissen D J, et al. Bioprinting of human pluripotent stem cells and their directed differentiation into hepatocyte-like cells for generation of mini-livers in 3D[J]. Biofabrication, 2015, 7(4):044102.
[55] Zhang J, Hartmann B, Siegel J, et al. Sacrificial-layer free transfer of mammalian cells using near infrared femtosecond laser pulses[J]. PLoS ONE, 2018, 13(5):e0195479.
[56] Koch L，Deiwick A，Chichkov B. Laser-based 3D cell printing for tissue engineering[J]. BioNanoMaterials，2014，(15)：71-78.
[57] Xiong R, Zhang Z, Chai W, et al. Study of gelatin as an effective energy absorbing layer for laser bioprinting[J]. Biofabrication, 2017,(9):24103-24117.

[58] Huang T Q. 3D printing of biomimetic microstructures for cancer cell migration.Biomed[J]. Microdevices,2014,(16):127-132.
[59] Cui X, Gao G, Qiu Y. Accelerated myotube formation using bioprinting technology for biosensor applications[J]. Biotechnology Letters, 2013,35(3):315-321.
[60] Christensen K, Xu C, Chai W, et al. Freeform inkjet printing of cellular structures with bifurcations[J]. Biotechnology & Bioengineering, 2015, (112):1047-1055.
[61] Suntivich R, Drachuk I, Calabrese R. Inkjet printing of silk nest a rrays for cell hosting [J].Biomacromolecules, 2014, 15(4):1428-1435.
[62] Owens C M，Marga F，Forgacs G. Biofabrication and testing of a fully cellular nerve graft[J]. Biofabrication, 2013,5(4):380-387.
[63] Lee V, Singh G, Trasatti J P, et al. Design and fabrication of human skin by three-dimensional bioprinting[J].Tissue Eng Part C Methods, 2014, 20(6):473-484.
[64] Xu T, Binder K W, Albanna M Z, et al. Hybrid printing of mechanically and biologically improved constructs for cartilage tissue engineering applications[J]. Biofabrication,2013,5(1):015001.